家蚕蛹生殖腺脱氧核糖核酸的特性*

夏邦颖　　郭郛
（中国科学院动物研究所）

引　　言

昆虫的重要生理特点之一就是具有强大的生殖能力。数千年来,我国劳动人民培育了家蚕的不同品种,并且利用杂交优势,提高蚕丝的产量和质量,使我国成为桑蚕的发源地和蚕丝出口国(蒋猷龙,1977)。研究家蚕生殖腺的代谢,特别是生殖细胞中携带遗传信息的脱氧核糖核酸(DNA)的理化性质,可为家蚕的繁殖和遗传提供必要的资料。

近年来,利用生物大分子DNA诱导遗传变异的工作,已在细菌、植物和某些动物种类中取得成功,说明细胞可以摄取外源DNA分子,而被摄取的DNA能控制遗传性状的出现(Ledoux, 1971; Gurdon, 1974)。在昆虫中,如以体细胞的DNA来进行诱导,可在当代和下一代出现形态变化,并能遗传到下代,如在果蝇(Fox等, 1971),地中海粉螟(Nawa和Yamada, 1968)和家蚕(Nawa等, 1971)等所获得的结果。因此,利用此种新技术有可能将特定品种家蚕的DNA来诱导另一品种,使它获得优良经济性状。

现将家蚕生殖腺DNA的一些理化性质的研究结果报道如下。

材料和方法

所用的家蚕品种为日东×华合,于1974年9月由北京良乡蚕种场提供蚕茧。

制备家蚕蛹生殖腺DNA的方法,主要参考Howell(1973)、Klett等(1968)和Marmur(1963)的工作。迅速解剖出家蚕生殖腺(睾丸或卵巢),分别放入盛有干冰的保温瓶中,在−20℃冰箱中保存(不超过一周)。将收集到的家蚕生殖腺乘冰冻时剪碎,在预冷的研钵中磨碎。按生殖腺重量加4—10倍体积的0.15*M*氯化钠-0.10*M*乙二胺四乙酸钠(pH:8.0)溶液(以下简称NaCl-EDTA溶液),在玻璃匀浆器中上下触击十次。所得匀浆在4℃下以5,000—6,000g离心10分钟收集核物质。倾去上部液体,用冷指将沉淀部分重悬于相当原匀浆体积一半的NaCl-EDTA中,再次离心。这种悬洗离心重复两次。由此所得之沉淀悬于NaCl-EDTA中,加1/10体积25%十二烷基硫酸钠溶液,于10℃以下温和搅动半小时,再加入$NaClO_4$(过氯酸钠)使成含1*M* $NaClO_4$溶液。在20℃室温下搅拌半小时后,加等体积(24:1 V/V)氯仿-异戊醇,在腕动振荡器上振荡20分钟。在～4℃以5,000g离心10分钟,收集水相,重复用氯仿-异戊醇去蛋白,直到界面不出现或只有少许蛋白为止。再将收集到的水相与等体积预冷乙醇混合,用玻璃棒缠出DNA纤维,在容器壁上压干,溶于稀释10倍的氯化钠-柠檬酸钠缓冲液中(以下简称SSC溶液)。用

* 工作中承生物物理所郭尧君同志协助测绘紫外吸收光谱,在此表示感谢。

10 × SSC 溶液将此含 DNA 之 0.1 × SSC 溶液调为 1 × SSC 溶液。再加入经 80℃ 处理 10 分钟之核糖核酸酶(RNase)溶液，使 RNase 终浓度为 100 微克/毫升。于 37℃ 保温 60 分钟，加入链霉蛋白酶(pronase)使终浓度为 1 毫克/毫升，在 37℃ 继续保温 30 分钟。与等体积氯仿-异戊醇振荡 15 分钟，离心去蛋白，此种去蛋白步骤可重复数次(上述用 RNase 处理步骤可代之以加入半体积的异丙醇溶液的方法，有选择地沉淀 DNA 以去掉 RNA)。由此所得到的水相 DNA 加入等体积预冷乙醇，用玻璃棒缠出 DNA 纤维。在 70% 乙醇中洗二次。可将 DNA 纤维于 70% 乙醇中在 −20℃ 冰箱储存备用。或溶于 0.1 × SSC 溶液中，在 −20℃ 储存。但注意避免反复融冻。

家蚕生殖腺 DNA 的紫外吸收光谱，系用 SV-50A 双光束紫外分光光度计测绘。

家蚕生殖腺 DNA 的热增色效应与变性曲线，依 Mandel 和 Marmur (1968) 的方法，在 Sp. 700 紫外分光光度计上测定。利用电加热升温附件测出溶于 0.1 × SSC 的 DNA 在 25℃至86℃之间各温度的紫外吸收值(O. D. 260 毫微米)，并校正升温时溶液体积膨胀产生的影响。以 25℃ 时测出的 260 毫微米吸收值作为基础值，计算增色效应，并绘出变性曲线。根据“熔解”温度(变性温度) Tm 值，代入公式

$$GC = (Tm - 53.9)2.44$$

计算鸟嘌呤和胞嘧啶占家蚕生殖腺 DNA 碱基的百分比。

用单向下行纸层析法(Smith 和 Feinberg, 1972)分析家蚕蛹卵巢 DNA 的碱基组成。将样品放入安培瓶中，加入浓度为 88% 以上的甲酸，氧焰封口后于 175℃ 消化 30 分钟。开封后放入 70—80℃ 水浴中，用氮气流吹去甲酸。完全干燥后，加入 1NHCl 溶解水解物。将水解液点样于 Whatman 1 号层析滤纸上。用异丙醇: HCl:水 (17:4.2:3.8) 溶剂系统进行层析。紫外灯下勾出荧光背景下的暗斑，测定其 Rf 值。剪下各暗斑滤纸和空白航路上相应位置同等面积的滤纸片，剪成梳状放入具塞试管中，加入 5 毫升 0.1 NHCl，于 37℃ 洗脱过夜，在 SV-50A 分光光度计上绘出各碱基洗脱液的紫外吸收光谱，进行定性定量测定。

标准碱基: 鸟嘌呤 上海试剂厂
腺嘌呤 Light England
胞嘧啶 Light England
5-甲基胞嘧啶 恒信化工厂
尿嘧啶 Carlo Erba Italy
胸腺嘧啶 Light England

结 果 和 讨 论

(一) 紫外吸收光谱

家蚕蛹睾丸 DNA 和卵巢 DNA 的紫外吸收光谱分别如图 1 和图 2。

家蚕蛹睾丸 DNA 最大吸收峰在 260 毫微米，最小吸收峰在 234 毫微米，260/280 紫外吸收比值为 2.02。家蚕蛹卵巢 DNA 最大吸收峰在 260 毫微米，最小吸收峰在 234 毫微米，260/280 比值为 2.00。

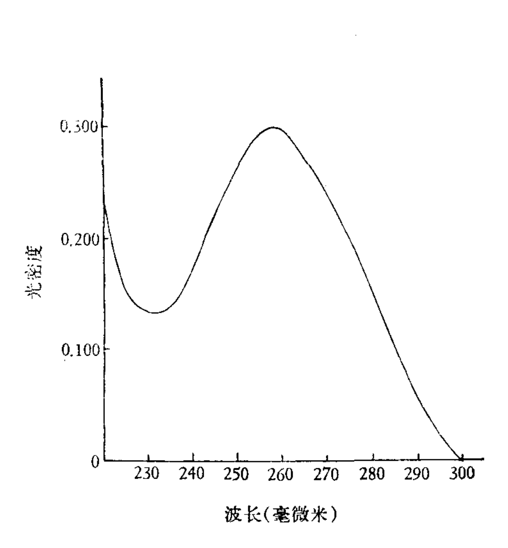


图 1 家蚕蛹睾丸 DNA 紫外吸收光谱
样品系溶于 0.1×SSC 溶液中

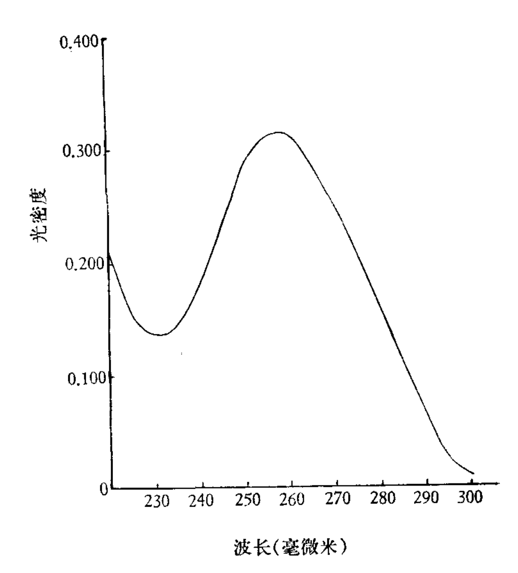


图 2 家蚕蛹卵巢 DNA 紫外吸收光谱
样品系溶于 0.1×SSC 溶液中

（二）热增色效应和“熔解”温度 Tm（变性温度）

利用家蚕生殖腺 DNA 在 Sp. 700 紫外分光光度计和电热升温装置，测定了雌雄两性生殖腺 DNA 的热变性曲线、增色效应和 Tm 值，图 3 及图 4 分别绘出睾丸和卵巢 DNA 的热变性曲线。

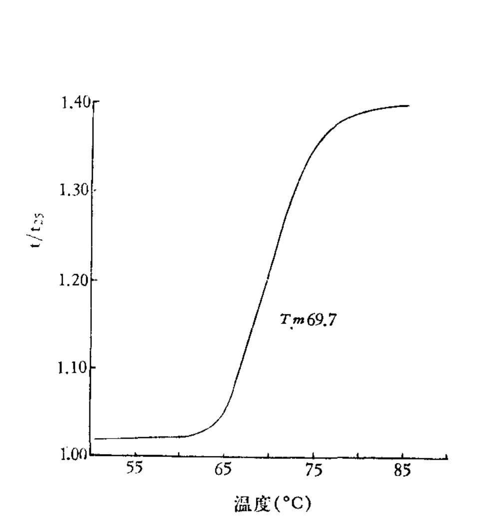


图 3 家蚕蛹睾丸 DNA 热变性曲线

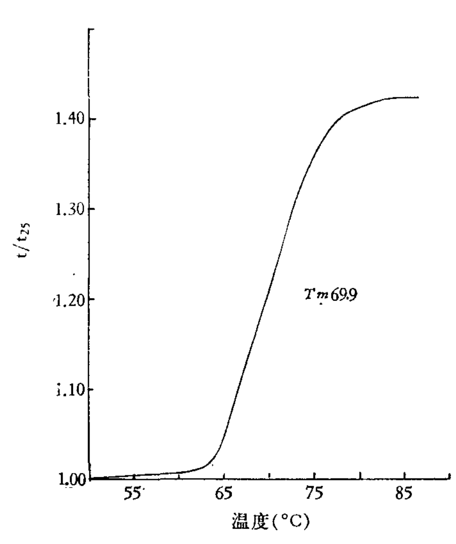


图 4 家蚕蛹卵巢 DNA 热变性曲线

高度纯化的 DNA 的完全热变性，应产生随温度升高而使在 260 毫微米处的吸收变化或即增色效应增加，接近或达到 40%。被其他紫外吸收物质污染的不纯制备物，在变性过程中吸收的增加不能达到或接近 40%。将增色效应对温度作图可得到一个转变曲线，对每种 DNA 皆有一个典型曲线，并与其中四个碱基克分子比例有关系。所谓变性是

DNA 分子的两个互补链的分开。从所增加温度而得到的转变中点即为 *Tm* 值 (Spencer, 1972; Mandel 和 Marmur, 1968)。

蚕蛹睾丸 DNA 热变性曲线测定结果表明,紫外吸收增色效应为 1.40, *Tm* 值为 69.7, 由 *Tm* 值计算 GC 百分含量为 38.6。变性熔点曲线可被看做为不同平均碱基组成的不同区域熔点的累积图形,每个 DNA 分子富含 AT 的区域预期会在富含 GC 的部分之前熔化。

蚕蛹卵巢 DNA 的紫外吸收增色效应为 1.42, *Tm* 值为 69.9, 由 *Tm* 值计算出的 GC 百分含量为 39。

由热变性曲线图形和紫外吸收增色效应来看,本实验所制备的家蚕雌雄两性生殖腺 DNA 的纯度,是符合高度纯化的 DNA 完全热变性应产生随温度升高而使吸收增加 40% 的要求的。

利用测定 *Tm* 的方法计算 DNA 样品中鸟嘌呤和胞嘧啶占总碱基中的百分含量是很方便的。由于 DNA 双股链中鸟嘌呤和胞嘧啶、腺嘌呤和胸腺嘧啶互补配对,因此,知道了 GC 的百分含量,可推算 AT 的百分含量,也就知道了该四种碱基各自的百分含量。

(三) 蛹卵巢 DNA 的碱基组成

经下行纸层析分离开来的家蚕蛹卵巢DNA的四种碱基——腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶

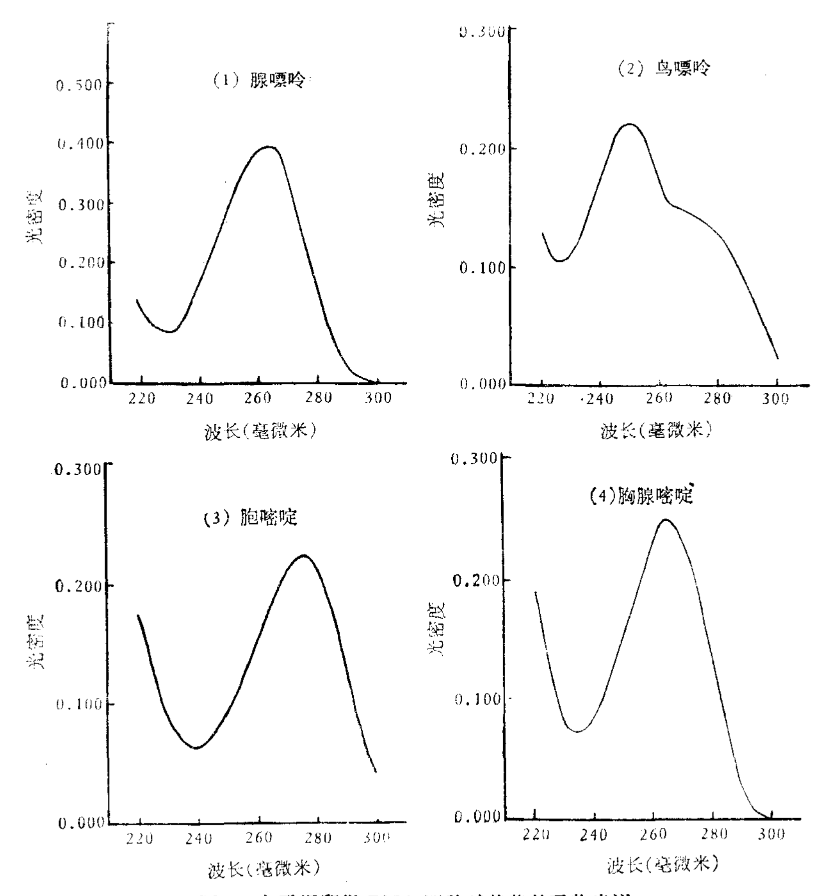


图 5 家蚕蛹卵巢 DNA 四种碱基紫外吸收光谱

各碱基皆溶于 0.1*N* HCl 中, 在 SV-50A 双光束紫外分光光度计上测绘

和胸腺嘧啶——紫外吸收光谱如图 5 所示。

鸟嘌呤最大吸收在 249 毫微米、最小吸收在 227 毫微米；腺嘌呤最大吸收在 263 毫微米、最小吸收在 229 毫微米；胞嘧啶最大吸收在 276 毫微米、最小吸收在 239 毫微米；胸腺嘧啶最大吸收在 265 毫微米、最小吸收在 234 毫微米。与标准碱基同时测绘的结果一致。

家蚕蛹卵巢 DNA 碱基组成经纸层析法测定的结果：鸟嘌呤 19.8%；腺嘌呤 30.6%；胞嘧啶 18.9%；胸腺嘧啶 30.6%。鸟嘌呤和胞嘧啶（G + C）占 38.7%，这与 *Tm* 值法测定的结果相符，而 *Tm* 值法则更为简便。此结果也与 Neulet（1967）的结果相近。

关于家蚕生殖腺 DNA 的热增色效应、*Tm* 值以及由 *Tm* 值法测定碱基组成的研究，尚未见报道。Chinzei（1974）研究了家蚕蛹脂肪体 DNA 的某些生化性质，其所制备的 DNA热增色效应在 1.34 左右，未达到 DNA 纯化的指标。Nawa 等（1974）从末龄家蚕体中制备了 DNA 来进行诱导家蚕幼虫产生遗传变异的研究，他们的基本想法是可取的，但其所制备的 DNA 纯度更差，热增色效应只有 28—30%，其 DNA 中含有 13—17% 的 RNA 污染。

应提及的，在紫外光灯下观察层析纸上荧光斑点时，除四种碱基外，尚有稀有碱基存在，有待进一步分析鉴定。关于家蚕蛹睾丸 DNA 的电镜观察及利用图形数字转换器和电子计算机测量 DNA 分子长度的实验结果另文报道。

结　　论

本文报道家蚕生殖腺（睾丸和卵巢）DNA 的制备方法、紫外吸收光谱和碱基组成。家蚕蛹睾丸 DNA 紫外吸收光谱表明 DNA 样品溶于 0.015 *M* NaCl-0.0015 *M* 柠檬酸钠溶液中，最大吸收峰在 260 毫微米；最小吸收峰在 234 毫微米。紫外吸收的热增色效应达 1.40，热变性熔点温度（*Tm* 值）为69.7℃，由 *Tm* 值计算 DNA 中鸟嘌呤和胞嘧啶（G + C）占碱基组成的 38.6%。

家蚕蛹卵巢 DNA 溶于 0.015 *M* NaCl-0.0015 *M* 柠檬酸钠缓冲液中的紫外吸收光谱图表明：最大吸收峰在 260 毫微米，最小吸收峰在 234 毫微米。紫外吸收热增色效应为 1.42。热变性熔解点温度（*Tm* 值）为 69.9℃。由 *Tm* 值计算的 DNA 中鸟嘌呤和胞嘧啶（G + C）占碱基组成的 39%。纸层析法分析的结果：鸟嘌呤 19.8%；腺嘌呤 30.6%；胞嘧啶 18.9%；胸腺嘧啶 30.6%，鸟嘌呤和胞嘧啶（G + C）38.7%。与 *Tm* 值法的测定结果相符。

上述结果表明本实验所制备的家蚕蛹生殖腺的 DNA，符合纯度要求。

参　考　文　献

夏邦颖、郭郛 1978 家蚕蛹睾丸 DNA 的电镜观察及其分子长度测量。实验生物学报(待发表)。
蒋猷龙 1977 数千年来我国桑蚕在家养下的演变。昆虫学报，**20** (3)：345—51。
Chinzei, Y. 1974 Biochemical properties of fat body DNA of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **20**(12)：2333—46.
Fox, A. S., S. B. Yoon, W. F. Duggleby & W. M. Gilbert 1971 Genetic transformation in *Drosophila*. *in* "Informative molecules in biological systems". Ed. by L. G. H. Ledoux. North-Holland Pub. Co. Amsterdam. pp. 313—33.
Gurdon, J. B. 1974 Molecular biology in a living cell. *Nature*, **248**(5451)：772—6.

Howell, S. H. 1973 The Isolation and analysis of DNA from eukaryotic cells, *in* "Molecular techniques and approaches in developmental biology". Ed. by M. J. Chrispeels, pp. 117—39. John Wiley & Sons.

Klett, R. P. & M. Smith 1968 Isolation of deoxy ribonucleate from invertebrate. *in* "Methods in Enzymology", **12**, part B, pp. 112—5. Academic Press, London.

Ledoux, L. G. H. (Ed.) 1971 Informative molecules in biological systems. North-Holland Pub. Co. Amsterdam.

Mandel, M. & J. Marmur 1968 Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the quanine plus cytosine content of DNA. *in* "Methods in Enzymology", **12**, part B, pp. 195—206. Academic Press, London.

Marmur, J. 1963 A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *in* "Methods in Enzymology", **6**: 726—38. Academic Press, New York.

Newa, S. & M. A. Yamada 1968 Hereditary change in *Ephestia* after treatment with DNA. *Genetics*, **58**(4): 573—84.

Nawa, S., B. Sakaguchi, M. A. Yamada & M. Tsujita 1971 Hereditary change in *Bombyx* after treatment with DNA. *Genetics*, **67**(2): 221—34.

Neulat, M. M. 1967 Comparison de differents DNA animaux par l'analyse de leurs sequences pyrimidiques. *Biochem. Biophys. Acta*, **149**: 422—34.

Spencer, J. H. 1972 The physics and chemistry of DNA and RNA. pp. 128—9. Philadelphia, Saunders.

Smith, I. & J. G. Feinberg 1972 Paper and thin layer chromatography and electrophordsis. 2d. edition. Longman.

CHARACTERISTICS OF THE DNA FROM PUPAL GONADS OF *BOMBYX MORI* L.

HSIA PANG-YING QUO FU

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

This paper deals with the preparation and determination of some fundamental properties of the DNA from the pupal gonads of *Bombyx mori* L. The results are as follows. The peak of u.v. absorption of the testicular DNA in 0.1×SSC (0.015 M NaCl plus 0.0015 M trisodium citrate. pH = 7.0) is at 260 nm; the minimum is at 234 nm. Thermal-hyperchromicity at 260 nm is 1.40. From the thermal denaturation curve it was found that the melting temperature (Tm) is 69.7°C. Calculation according to the equation $GC = (Tm - 53.9) \times 2.44$ gives the percentage content of quanine plus cytosine (G + C) to be 38.6% of the total bases.

The u.v. absorption peak of the ovarian DNA in the same solution is at 260 nm; the minimum is at 234 nm. The thermal-hyperchromicity at 260 nm is 1.42. The melting temperature (Tm) is 69.9°C. The percentage content of quanine plus cytosine is 39.0% of the total bases. The decending paper chomatograpy yielded results showing G + C to be 38.7% of the total bases.